

03. Dez. 1998
5

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



09/555780

REC'D	11 FEB 1999
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Erythropoietin mit hoher spezifischer Aktivität"

am 3. Dezember 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole A 61 K und C 07 K der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 3. November 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Zeichen: 197 53 681.6

Nietiedt

PATENTANWÄLTE

H. WEICKMANN
DIPLO.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPLO.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKA**
DIPLO.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPLO.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPLO.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPLO.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPLO.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN
KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN
TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621
TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

Unser Zeichen:
17791P DE/WWvo

Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof



angebracht

3. Dez. 1997

Erythropoietin mit hoher spezifischer Aktivität

Erythropoietin mit hoher spezifischer Aktivität

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue EPO-Zusammensetzungen mit hoher spezifischer Aktivität, die durch einen hohen Gehalt an N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten oder/und tetraantennären Verzweigungen in der Kohlenhydratstruktur gekennzeichnet sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen solcher EPO-Produkte.

10

15

Erythropoietin (EPO) ist ein humanes Glycoprotein, welches die Produktion von roten Blutzellen stimuliert. EPO kommt im Blutplasma von gesunden Personen nur in sehr geringen Konzentration vor, so daß eine Bereitstellung in größeren Mengen auf diese Weise nicht möglich ist. EP-B-O 148 605 und EP-B-O 205 564 beschreiben die Herstellung von rekombinantem humanen EPO in CHO-Zellen. Das in EP-B-O 148 605 beschriebene EPO weist ein höheres Molekulargewicht als urinäres EPO und keine O-Glykosilierung auf. Das in EP-B-O 205 564 beschriebene EPO aus CHO-Zellen ist mittlerweile in großen Mengen und in reiner Form verfügbar.

20

Weiterhin ist die Gewinnung von humanem EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie bekannt (Miyake et al., J. Biol. Chem. 252 (1977), 5558-5564).

25

30

Rekombinantes und urinäres EPO wird als Gemisch verschiedener Isoformen gewonnen, von denen bekannt ist, daß sie sich in ihrem Sialylierungsgrad unterscheiden. Diese EPO-Isoformen weisen unterschiedliche isoelektrische Punkte auf und können durch isoelektrische Fokussierung bzw. Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden (siehe Tsao et al., Biotech. Bioeng. 40 (1992), 1190-1196; Nieto et al., Anal. Commun. 33 (1996), 425-427; Tran et al., J. Chromatogr. 542 (1991), 459-471; Bietot et al., J. Chromatogr.

759 (1997), 177-184; Watson et al. Anal. Biochem. 210 (1993), 389-393). Die Isoformen mit der höchsten Anzahl von Sialinsäuren weisen die höchste spezifische Aktivität auf, während die mit der niedrigsten Anzahl die geringste Aktivität besitzen (siehe z.B. Imai et al., Eur. J. Biochem. 194
5 (1990), 457-462; EP-A-O 428 267).

Takeuchi et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 7819-7822) beschreiben einen Zusammenhang der biologischen Aktivität mit dem Sialinsäuregehalt und dem Verhältnis von bi- und tetraantennären Kohlenhydratstrukturen. Takeuchi et al. kommen weiterhin zur Schlußfolgerung, daß
10 die in den EPO-Kohlenhydratstrukturen vorhandenen N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharideinheiten nicht mit der biologischen Aktivität korrelieren.

Fukuda et al. (Blood 73 (1989), 84-89) befassen sich mit der Geschwindigkeit der Elimination von EPO aus dem Blutkreislauf, die wesentlich zur
15 biologischen Aktivität beiträgt, und kommen zu dem Schluß, daß EPO mit einer größeren Anzahl an N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten schneller aus dem Kreislauf entfernt wird als EPO ohne Lactosamin-Einheiten. Morimoto et al. (Glycoconjugate J. 13 (1996), 1093-1120) beschreiben die Auftrennung
20 von EPO-Isoformen mittels Mono-Q-Chromatographie, so daß die einzelnen Fraktionen jeweils aus nur noch wenigen Isoformen bestehen. Die mit diesen Fraktionen durchgeführten Untersuchungen zeigen eine Gleichverteilung aller Strukturen in allen Fraktionen. Es wird keine Korrelation des Gehalts an bi- oder triantennären Strukturen oder des Gehalts an N-Acetyl-
25 Lactosamin-Einheiten mit der spezifischen Aktivität gefunden.

Somit geht aus dem genannten Stand der Technik hervor, daß eine generelle Korrelation der biologischen Aktivität mit der Zuckerstruktur besteht, insbesondere im Hinblick auf den Gehalt an Sialinsäuren. Es findet sich
30 jedoch keinerlei Hinweis, daß der Anteil an tetraantennären Strukturen oder/und der Anteil an N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharideinheiten eine direkte Korrelation mit der biologischen Aktivität besitzt.

Überraschenderweise wurde bei der Aufreinigung von EPO-Präparationen festgestellt, daß eine Erhöhung des Anteils an tetraantennären Kohlenhydratstrukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharid-Einheiten in der Kohlenhydratstruktur zu einer signifikanten Verbesserung der spezifischen biologischen Aktivität führt. Dies trifft insbesondere zu bei der Herstellung von EPO in einer humanen Zelllinie gemäß den europäischen Anmeldungen 97 112 649.5 und 97 112 640.4.

Vergleichende Aktivitätsuntersuchungen einzelner EPO-Präparationen oder EPO-Isoformen, deren Kohlenhydratstruktur sich im wesentlichen nur im Gehalt der N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharideinheiten unterscheidet, zeigen eine signifikant höhere Aktivität für die Präparationen oder Isoformen mit dem höheren Anteil an N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bei gleichen Sialinsäuregehalt und bei etwa gleicher Antennarität. Außerdem wurde gefunden, daß gerade in Präparationen oder Isoformen mit einem erhöhten Anteil an triantennären Strukturen der Gehalt an Lactosamin-Einheiten für die in vivo Aktivität von erheblicher Bedeutung ist. Weiterhin wurde festgestellt, daß durch Erhöhung des Anteils an tetrantennären Strukturen eine Verbesserung der biologischen Aktivität erreicht werden kann.

Ist man folglich bestrebt, ein EPO-Präparat mit möglichst hoher spezifischer Aktivität und in hoher Ausbeute zu erzeugen, so ist bei der Auswahl der Aufreinigungsschritte, der Produktionszellen oder/und bei deren Kultivierung auf einen möglichst hohen Anteil von tetraantennären Kohlenhydratstrukturen oder/und Lactosamin-Disaccharideinheiten zu optimieren.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine EPO-Zusammensetzung, die im wesentlichen aus glykosilierten EPO-Molekülen besteht, die einen Anteil von mindestens 75% vorzugsweise mindestens 80% und am meisten bevorzugt mindestens 85% tetraantennären Strukturen bezogen auf die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten, d.h. die Summe von bi-, tri- und tetraantennären Strukturen, enthalten.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine EPO-Zusammensetzung, die im wesentlichen aus glykosilierten EPO-Molekülen besteht, die eine Anzahl von mindestens 3,7, vorzugsweise von mindestens 4,0 und am meisten bevorzugt mindestens 4,5 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf eine Glykosilierungsstelle des EPO-Moleküls bzw. eine Anzahl von mindestens 11,1, vorzugsweise von mindestens 12,0 und am meisten bevorzugt von mindestens 13,5 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf die 3 Glykosilierungsstellen des EPO-Moleküls enthalten.

Die Angabe "im wesentlichen" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die gewünschten EPO-Moleküle in einem Anteil von vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und am meisten bevorzugt von mindestens 95% bezogen auf die Gesamtzahl der EPO-Moleküle in der Zusammensetzung vorhanden sind.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine EPO-Zusammensetzung, die aus glykosilierten EPO-Molekülen besteht, die einen mittleren Anteil von mindestens 75%, vorzugsweise von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 85% tetraantennären Strukturen bezogen auf die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten enthalten.

Außerdem betrifft die Erfindung eine EPO-Zusammensetzung, die aus glykosilierten EPO-Molekülen besteht, die eine mittlere Anzahl von mindestens 3,7, vorzugsweise von mindestens 4,0 und besonders bevorzugt von mindestens 4,5 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf eine Glykosylierungsstelle des EPO-Moleküls bzw. eine Anzahl von mindestens 11,1, vorzugsweise von mindestens 12,0 und am meisten bevorzugt von mindestens 13,5 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf die 3 Glykosilierungsstellen des EPO-Moleküls enthalten.

30

Die Höchstgrenze des Anteils an tetraantennären Strukturen kann bis zu 100% der gesamten Kohlenhydratketten reichen. Die Anzahl an N-Acetyl-

Lactosamin-Einheiten pro Glykosilierungsstelle kann bis zu 6 (tetraantennäre Strukturen und 2 zusätzliche N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten) betragen oder - bei Strukturen mit mehr als 2 zusätzlichen N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten - sogar noch höher sein.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine EPO-Zusammensetzung, welche die Merkmale von mindestens zwei oder mehreren der zuvor genannten Aspekte aufweist.

10

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann aus einer oder mehreren Isoformen, d.h. EPO-Molekülen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten bei der isoelektrischen Fokussierung, bestehen. Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein Gemisch aus mindestens 2, z.B. aus 2 bis 5 Isoformen, insbesondere ein Gemisch aus 3 oder 4 Isoformen.

15

Die spezifische Aktivität der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist vorzugsweise mindestens 200 000 IU/mg in vivo (normozythämische Maus). Besonders bevorzugt ist die spezifische Aktivität im Bereich von etwa 200 000 bis 400 000 IU/mg Protein, am meisten bevorzugt im Bereich von 250 000 bis 400 000 IU/mg Protein.

20

Der mittlere Sialinsäuregehalt pro Molekül EPO beträgt in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung vorzugsweise 11 bis 14, besonders bevorzugt mindestens 11,5 und am meisten bevorzugt mindestens 12,5.

25

Das Produkt aus der Anzahl der N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten pro Glykosilierungsstelle multipliziert mit dem mittleren Sialinsäuregehalt hat vorzugsweise einen Wert von mindestens 45, besonders bevorzugt von mindestens 50 und am meisten bevorzugt von mindestens 55.

30

Die erfindungsgemäße EPO-Zusammensetzung ist einerseits erhältlich aus EPO-Molekülen, die das Produkt einer Expression exogener DNA in Säugerzellen, z.B. in Nagetierzellen, wie etwa CHO- oder BHK-Zellen sind, wie sie in EP-B-O 205 564 beschrieben ist. Alternativ kann die Zusammen-

5 setzung auch aus EPO-Molekülen bestehen, welche das Produkt einer Expression endogener DNA nach Genaktivierung in humanen Zellen, z.B. in immortalisierten Zelllinien wie etwa Namalwa (Nadkarni et al, Cancer 23 (1969), 64-79), HT1080 (Rasheed et al., Cancer 33 (1973), 1027-1033) oder HeLa S3 (Puck et al., J. Exp. Meth. 103 (1956), 273-284) sind. Derartige Verfahren sind in den europäischen Patentanmeldungen 97 112 640.4 und 97 112 649.5 beschrieben, deren Offenbarung zum Bestandteil der vorliegenden Anmeldung gemacht wird.

Besonders bevorzugt wird eine EPO-Zusammensetzung verwendet, die

15 durch Kultivierung von EPO-Produktionszellen in einem Kulturmedium mit geringem Serumgehalt, z.B. maximal 1% (v/v) oder insbesondere in einem serumfreien Kulturmedium hergestellt wurde (vgl. hierzu WO 96/35718). Beispiele für geeignete Kulturmedien sind RPMI 1640 oder DMEM.

Die erfindungsgemäße EPO-Zusammensetzung kann als pharmazeutisches Präparat gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Verdünnungs-, Hilfs- und Trägermitteln formuliert werden. Die erfindungs-

20 gemäße EPO-Zusammensetzung, die zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats eingesetzt werden kann, hat eine Reinheit von vorzugsweise mindestens 99% und besonders bevorzugt von mindestens 99,9% bei Bestimmung durch Reverse Phase-HPLC (z.B. auf einer Vydac C4-Säule) und/oder Größenausschlußchromatographie (z.B. auf einen TSK 2000SW Ultrapac-Säule).

Außerdem weist die erfindungsgemäße Zusammensetzung einen DNA-Gehalt von vorzugsweise < 10 pg, besonders bevorzugt < 5 pg und am meisten bevorzugt < 1 pg DNA pro 10 000 IU Protein auf. Außerdem ist

30

die erfindungsgemäße Zusammensetzung vorzugsweise weitgehend frei von bakteriellen Verunreinigungen (< 1 CFU/ml) und Endotoxinen (< 1 EU/10 000 IU Protein).

5 Die Bestimmung des DNA-Gehalts kann durch einen Hybridisierungstest mit radioaktiver oder fluoreszenzmarkierter DNA erfolgen. Als Sonden-DNA wird z.B. kommerziell erhältliche aufgereinigte Human-DNA verwendet. Die Human-DNA kann zudem als Standard für den Test eingesetzt werden. Die untere Nachweisgrenze eines solchen Hybridisierungstests beträgt etwa
10 0,3 pg/10 000 IU EPO. Der Keim- und Endotoxingehalt in der EPO-Präparation kann nach standardisierten Methoden bestimmt werden, wie sie in Pharm. Eu. oder USP beschrieben sind.

Eine EPO-Zusammensetzung in erfindungsgemäß erwünschten Merkmalen
15 ist erhältlich durch mindestens eine der folgenden Maßnahmen:

- (a) Auswahl einer geeigneten Produktionszelllinie, welche in der Lage ist, Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Strukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten zu erzeugen,
- 20 (b) Auswahl von geeigneten Kultivierungsbedingungen bei der Zellkultur, um Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Struktur oder/und N-Acetyl-Lactosamineinheiten zu erzeugen und
- (c) Abtrennung unerwünschter Bestandteile aus einer bekannten Zusammensetzung von EPO-Molekülen unter Anreicherung von EPO-Molekülen, die Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Strukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten
25 enthalten.

Maßnahme (a) umfaßt die Auswahl einer geeigneten Produktionszelle.
30 Einerseits kann man hier Zellen verwendet, von denen bekannt ist, daß sie eine Tendenz aufweisen, die gewünschten Kohlenhydratkettenstrukturen mit großer Ausbeute herzustellen. Beispiele für solche Zelllinien sind vom

Hamster abgeleitete Zellen wie CHO oder BHK und humane Zelllinien wie HeLa, Namalwa, HT1080 oder davon abgeleitete Zelllinien. Besonders bevorzugt sind HeLaS3-Zellen oder modifizierte CHO-Zellen.

5 Andererseits können geeignete Produktionszellen auch gezielt erzeugt werden, indem bestimmte Glykosilierungsenzyme in der Zelle überexprimiert werden, z.B. durch rekombinante Expression oder/und durch endogene Genaktivierung. Beispiele solcher Glykosilierungsenzyme sind Sialyltransferasen und N-Acetyl-Lactosamintransferasen.

10

Maßnahme (b) umfaßt die Auswahl geeigneter Kultivierungsbedingungen bei der Zellkultur. Beispielsweise kann durch Zusatz von bestimmten zuckerhaltigen Nährmedien der Anteil an tetraantennären Kohlenhydratstrukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten in den Kohlenhydratketten erhöht werden. Beispielsweise sind Nährmedien geeignet, die Galactose oder/und Mannose enthalten.

15

Maßnahme (c) umfaßt die Abtrennung unerwünschter Bestandteile aus einer bekannten EPO-Zusammensetzung, die in ihrer Kohlenhydratstruktur die Spezifikationen der vorliegenden Anmeldung nicht erfüllt. Dies kann beispielsweise erfolgen durch chromatographische Aufreinigung der EPO-Präparationen, z.B. durch Affinitätschromatographie an Triazinfarbstoffgelen, vorzugsweise Cibacron Blue-Farbstoffgelen. Eine weitere Abtrennung unerwünschter Bestandteile kann auch mit hydrophober Interaktionschromatographie und Reversed Phase Chromatographie durchgeführt werden. Dafür geeignete Liganden sind Butyl-, Octyl- und Phenyl-Reste. Mit Kapillarzonenoelektrophorese-Analytik (CZE) können geeignete Fraktionen ermittelt, gepoolt und schließlich weiterverarbeitet werden. Außerdem kann unter Verwendung von Lectinen aus Tomaten oder Kartoffeln (Merkle, Cummings, J. Biol. Chem. 262 (1987), 8179-8189) eine direkte Anreicherung von EPO-Molekülen mit einem hohen Anteil an N-Acetyl-Lactosamin-

20

25

30

Einheiten erfolgen. Bevorzugt werden solche Lectine in immobilisierter Form eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung der spezifischen Aktivität einer EPO-Zusammensetzung, wobei man EPO-Moleküle mit einem hohen Anteil an tetraantennären Kohlenhydratstrukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten in der Zusammensetzung anreichert. Diese Anreicherung kann durch eine oder mehrere der oben genannten Maßnahmen (a), (b) und (c) erfolgen.

10

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1 Aufreinigung von EPO aus Kulturüberständen von Zelllinien

15

Im wesentlichen wurden zur Aufreinigung von EPO aus Zellkulturüberständen von humanen Zellen oder CHO-Zellen zwei Methoden verwendet, die sich in Anzahl und Prinzip der Chromatographieschritte unterschieden und abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und der EPO-Konzentration eingesetzt wurden:

20

Methode 1: 1. Schritt: Blue-Sepharose-Säule
 2. Schritt: Butyl-Sepharose-Säule
 3. Schritt: Hydroxyapatit-Säule
 4. Schritt: Aufkonzentrierung

25

Methode 2: 1. Schritt: Blue-Sepharose-Säule
 2. Schritt: Hydroxyapatit-Säule
 3. Schritt: Aufkonzentrierung
 (alternativer 3. Schritt: RP-HPLC)

30

Beispiel für eine Aufreinigung eines Hela S3-Zellkulturüberstandes mit 2 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) nach Methode 1:

1. Blue Sepharose-Säule:

5

Eine 5 ml Hi-Trap-Blue-Säule (Blue-Sepharose-Fertigsäule von Pharmacia) wurde mit mindestens 5 Säulenvolumina (SV) Puffer A (20 mM Tris-HCl, pH, 7,0; 5 mM CaCl_2 ; 100 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden 70 ml Hela-Zellüberstand (ca. 245 μg EPO und 70-100 mg Gesamtprotein enthaltend) über Nacht bei einem Fluß von 0,5 ml/min im Kreislaufverfahren aufgezogen.

10

15

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer B (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM CaCl_2 ; 250 mM NaCl) und mindestens 5 SV Puffer C (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM CaCl_2 , 250 mM NaCl) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt

20

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM CaCl_2 ; 2 M NaCl) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

25

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über Reverse-Phase (RP)-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule (Boehringer Mannheim) bestimmt. Alternativ wurde zur qualitativen Identifizierung EPO-haltiger Fraktionen ein immunologischer Dotblot durchgeführt.

30

EPO-haltige Fraktionen (8-12 ml) wurden gepoolt und auf eine Butyl-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die Ausbeute nach der Blue-Sepharose-Säule betrug ca. 175 μ g EPO (entspricht ca. 70%). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute nach Blue-Sepharose zwischen 50-75%.

5 2. Butyl-Sepharose-Säule (Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie)

10

Eine selbsthergestellte 2-3 ml Butyl-Sepharose-Säule (Material: Toyopearl Butyl S650) wurde mit mindestens 5 SV Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM CaCl_2 ; 2 M NaCl) äquilibriert und anschließend der EPO-haltige Blue-Sepharose-Pool aus 1. (ca. 150 μ g EPO) bei einem Fluß von 0,5 ml/min aufgezogen.

15

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer E (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl und 10 % Isopropanol) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt.

20

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer F (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl und 20 % Isopropanol) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

25

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über RP-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule bestimmt. Alternativ wurde zur qualitativen Identifizierung EPO-haltiger Fraktionen ein immunologischer Dotblot durchgeführt.

30

EPO-haltige Fraktionen (10-15 ml) wurden gepoolt und auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen.

Die Ausbeute der Butyl-Sepharose-Säule betrug ca. 130 μ g EPO (entspricht ca. 85 %). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute der Butyl-Sepharose zwischen 60-85% vom Auftrag der Blue-Sepharose-Pools.

3. Hydroxyapatit-Säule

Eine 5 ml Hydroxyapatit-Säule (Econo-Pac CHT II-Fertigsäule von BioRAD) wurde mit mindestens 5 SV Puffer F (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl; 20% Isopropanol) äquilibriert und anschließend der EPO-haltige Butyl-Sepharose-Pool aus 2. (ca. 125 µg EPO) bei einem Fluß von 0,5 ml/min aufgezogen.

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer G (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt.

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer H (10 mM Na-Phosphat, pH 7,0; 80 mM NaCl) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über RP-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule bestimmt.

EPO-haltige Fraktionen (3-6 ml) wurden gepoolt. Die Ausbeute der Hydroxyapatit-Säule betrug ca. 80 µg EPO (entspricht ca. 60%). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute der Hydroxyapatit-Säule zwischen 50-65% vom Auftrag der Butyl-Sepharose-Pools.

4. Aufkonzentrierung

Die gepoolten EPO-Fraktionen aus dem Hydroxyapatit-Schritt wurden in Zentrifugationseinheiten mit einer Ausschlußgröße von 10 kD (z.B. Microsep von Filtron) auf eine Konzentration von 0,1-0,5 mg/ml aufkonzentriert, mit 0,01% Tween 20 versetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Ausbeuteschema:

	EPO (μ g)	Ausbeute (%)
Ausgang	245	100
Blue-Sepharose	175	70
Butyl-Sepharose-Säule	130	53
Hydroxyapatit-Säule	80	33
Aufkonzentrierung	60	25

Die Reinheit des isolierten EPO war etwa > 90%, in der Regel sogar > 95%.

Zur Erhöhung der EPO-Ausbeute wurde auch die Methode 2 verwendet, bei der der Butyl-Sepharose-Schritt fehlte. Vor allem bei Zellkulturüberständen ohne oder mit 1 % (v/v) FKS-Zusatz ist diese Methode anwendbar und liefert isoliertes EPO von ungefähr gleicher Reinheit (90-95%). Die Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 im Äquilibrierungspuffer (Puffer F) für die Hydroxyapatit-Säule führte bei dieser Methode zu einer verbesserten Bindung und damit auch zu einem reproduzierbaren Elutionsverhalten von EPO beim Hydroxyapatit-Schritt. Deshalb wurde bei Methode 2 bei prinzipiell gleichem Ablauf wie Methode 1 mit folgenden Puffern durchgeführt:

1. Blue-Sepharose-Säule:

Äquilibrierpuffer (Puffer A): 20 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 ; 100 mM NaCl
Waschpuffer 1 (Puffer B): 20 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 ; 250 mM NaCl
Waschpuffer 2 (Puffer C): 20 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 , 250 mM NaCl

Elutionspuffer (Puffer D): 100 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 ; 2 M NaCl

2. Hydroxyapatit-Säule

- 5 Äquilibrierpuffer (Puffer F): 50 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 ; 1 M NaCl
- Waschpuffer (Puffer G): 10 mM Tris-HCl, pH 7,0;
5 mM CaCl_2 ; 80 mM NaCl
- 10 Elutionspuffer (Puffer H): 10 mM Na-Phosphat, pH 7,0;
0,5 mM CaCl_2 ; 80 mM NaCl

Ausbeuteschema:

	EPO (μg)	Ausbeute (%)
Ausgang	600	100
Blue-Sepharose	450	75
15 Hydroxyapatit-Säule	335	55
Aufkonzentrierung	310	52

20 Der Zusatz von 5 mM KCl in die Puffer B und G bei Methode 1 führte ebenfalls zu einer besseren Bindung und definierteren Elution von der Hydroxyapatit-Säule.

Alternativ bzw. zusätzlich können für die Aufreinigung von EPO noch folgende Schritte verwendet werden:

- 25
- RP-HPLC z.B. mit Vydac C4-Material
 - DEAE-Sepharose ff Chromatographie
 - Diafiltration

Beispiel 2 Bestimmung der spezifischen Aktivität in vivo von EPO (Bioassay an der normozythämischen Maus)

Die dosisabhängige Aktivität von EPO auf die Vermehrung und Differenzierung von Erythrozyten-Vorläuferzellen wurde in vivo in Mäusen über den Anstieg der Reticulocyten im Blut nach EPO-Gabe bestimmt.

Hierzu wurde jeweils acht Mäusen verschiedene Dosen der zu analysierenden EPO-Probe und eines EPO-Standards (abgeglichen gegen den EPO-WHO-Standard) parenteral verabreicht. Die Mäuse wurden anschließend unter konstanten definierten Bedingungen gehalten. 4 Tage nach EPO-Gabe wurde den Mäusen Blut entnommen und die Reticulocyten mit Acridinorange angefärbt. Die Bestimmung der Reticulocytenzahl pro 30 000 Erythrocyten erfolgte mikrofluorimetrisch im Durchflußcytometer durch Analyse des Rotfluoreszenz-Histogramms.

Die Berechnung der biologischen Aktivität erfolgte aus den Werten für die Reticulocytenzahlen der Probe und des Standards bei unterschiedlichen Dosen nach dem von Linder beschriebenen Verfahren der paarweisen Gehaltsbestimmung mit parallelen Geraden (Linder, Planen und Auswerten von Versuchen, 3. Auflage, 1969, Birkenhäuser Verlag, Basel).

Bei der Aufreinigung von EPO aus Kulturüberständen von in serumfreiem Medium kultivierten CHO-Zellen wurde ein EPO-Präparat erhalten, welches eine biologische Aktivität von 203 000 IU/mg hatte. In vier Ansätzen, bei denen EPO aus Kulturüberständen von humanen Zellen aufgereinigt wurde, erhielt man Produkte mit spezifischen Aktivitäten von 220 000 (Präparat 1), 198 000 (Präparat 2), 204 000 (Präparat 3) bzw. 100 000 IU/mg (Präparat 4).

Beispiel 3 Bestimmung des Gehalts an Sialinsäureresten

Die Bestimmung des Sialinsäuregehaltes erfolgte chromatographisch über HPAEC-PAD (High pH Anion Exchange Chromatography mit Pulsed
5 Amperometric Detection) auf einem Dionex System nach enzymatischer Abspaltung der Sialinsäuren mit Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* (*A. ureaf.*, Boehringer Mannheim).

10 Ansätze mit je 22 µg EPO aus verschiedenen Präparationen aus CHO- und humanen Zelllinien (z.B. HeLa S3) wurden auf eine EPO-Konzentration von 0,2 mg/ml in 5 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2 eingestellt. Je eine Hälfte jedes Ansatzes wurde für die genaue Bestimmung der EPO Menge über RP-HPLC verwendet. Zur 2. Hälfte der Ansätze wurde je 5 mM U Neuramini-
15 dase von *A. ureaf.* gegeben und über Nacht (ca. 18 h) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Verdauansätze halbiert, 20-fach auf 500 µl mit H₂O verdünnt und 50 µl davon (entspricht ca. 27 pmol EPO) auf das Dionex System aufgetragen. Hierzu wurden folgende Chromatographie-Parameter verwendet:

20 Säule: CarboPac PA 100
Fluß: 1,0 ml/min
Detektorempfindlichkeit: 300 nA

Gradient:	t (min)	% Puffer B
25	0	17
	7	17
	9	100
	12	100
	13	0
30	20	0

Puffer A: 0,1 M NaOH

Puffer B: 0,1 M NaOH; 0,5 M Na-Acetat

Die Menge an Sialinsäuren in der aufgetragenen Probe wurde mit Hilfe einer Eichgerade, die aus Werten eines mitgeführten Sialinsäurestandards (Boehringer Mannheim) erhalten wurde, ermittelt. Der Sialinsäuregehalt (mol Sialinsäure/mol EPO) wurde aus dem Ergebnis der Sialinsäurebestimmung (Dionex System) und der Bestimmung der eingesetzten EPO-Menge über RP-HPLC berechnet.

Das EPO aus CHO-Zellen hatte einen mittleren Gehalt von 11,3 mol Sialinsäure pro mol EPO. Die aus humanen Zellen stammenden EPO-Präparationen hatten einen Anteil von 13,1 mol (Präparat 1), 13,2 mol (Präparate 2 und 3) bzw. 11,5 mol (Präparat 4) Sialinsäure pro mol EPO.

Beispiel 4 Bestimmung des Anteils an tetraantennären Strukturen

Die Analytik der N-gebundenen Kohlenhydratstrukturen erfolgte chromatographisch über HPAEC-PAD auf einem Dionex System. Die asialo Oligosaccharide von EPO-Präparationen aus CHO- und humanen Zelllinien (z.B. HeLa S3) wurden durch enzymatische Abspaltung mit N-Glycosidase F (Boehringer Mannheim) und Neuraminidase aus A.ureaf. (Boehringer Mannheim) gewonnen.

Ca. 30 μ g EPO je Ansatz wurden mittels MicroCon-Ultrazentrifugationseinheiten (Amicon, Ausschlußgröße 10 kD) entsalzt und mit 10 mM N-Phosphat-Puffer, pH 7,2 auf eine Konzentration von 0,2 bis 0,3 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 1 U N-Glycosidase F und 10 mU Neuraminidase versetzt und über Nacht (ca 18 h) bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung des EPO-Polypeptidanteils von den abgespaltenen Oligosacchariden wurden die Ansätze nach der Inkubation durch Ultrafree-Zentrifugationseinheiten (Millipore, Ausschlußgröße 10 kD) zentrifugiert und das Ultrafree-Device zweimal mit 20 μ l H₂O nachgewaschen. Die im Durchlauf enthaltenen Oligosaccharide wurden mit H₂O auf 150 μ l aufgefüllt

und 100 μ l davon auf dem Dionex System analysiert. Hierzu wurden folgende Chromatographie-Parameter verwendet:

Säule: CarboPac PA 100

5 Fluß: 1,0 ml/min

Detektorempfindlichkeit: 300 nA

Gradient:	t (min)	% Puffer B
	0	0
	2	0
	60	10
	62	100
	67	100
	69	0
15	80	0

Puffer A: 0,1 M NaOH

Puffer B: 0,1 M NaOH; 0,5 M Na-Acetat

20 Die Identifikation der Peaks in einem Chromatogramm von N-Zuckern des komplexen Typs erfolgte durch Standard-Oligosaccharide (Glyco Systems) und wurde durch den enzymatischen Verdau der Oligosaccharide von EPO mit dem Enzym Endo- β -Galactosidase bzw. Fucosidase und anschließender Analytik auf dem Dionex System verifiziert. Die Berechnung der prozentua-

25 len Anteile an bi-, tri- und tetraantennären Strukturen erfolgte über die Flächen der Peaks, die die entsprechenden N-Zuckerstruktur repräsentieren, bezogen auf die Gesamtpeakfläche (Summe der Peakflächen von bi-, tri- und tetraantennären Strukturen).

30 Das aus CHO-Zellen stammende EPO hatte einen Anteil von 4,8% biantennären Kohlenhydratstrukturen, 17,3% triantennären Kohlenhydratstrukturen und 77,9% tetraantennären Kohlenhydratstrukturen. Bei den

Präparationen von EPO aus humanen Zelllinien wurden Anteile an biantennären/triantennären/tetraantennären Strukturen für Präparat 1 von 5,8/8,8/85,4 %, für Präparat 2 von 5,1/12,7/82,2%, für Präparat 3 von 4,1/17,7/78,2% und für Präparat 4 9,6/24,8/65,6% erhalten.

5

Beispiel 5 Bestimmung des Anteils an N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten

Die Anteile an N-gebundenen Kohlenhydratstrukturen von EPO mit zusätzlichen N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten wurden aus den Chromatographie-Ergebnissen der Experimente von Beispiel 4 berechnet. Die Berechnung der prozentualen Anteile N-gebundener Kohlenhydratstrukturen von EPO mit zusätzlichen N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten erfolgte über die Summe der Flächen der entsprechenden Peaks und der Gesamtfläche aller N-Zucker repräsentierender Peaks.

10

15

Bei EPO aus CHO-Zellen wurde eine Anzahl von 4,56 N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharideinheiten pro Glykosilierungsstelle gefunden. Bei den EPO-Präparationen aus humanen Zellen wurde eine Anzahl an N-Acetyl-Lactosamin-Disaccharideinheiten von 4,0 (Präparat 1), 3,98 (Präparat 2), 3,89 (Präparat 3) bzw. 3,5 (Präparat 4) gefunden.

20

Die Berechnung der Anzahl (n) von N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten pro Glykosilierungsstelle war wie folgt.

25

$$n = \sum \% (bi) \times 2 + \% (tri) \times 3 + \% (tetra) \times 4 + \% (tri + 1r) \times 4 + \% (tetra + 1r) \times 5 + \% (tri + 2r) \times 5 + \% (tetra + 2r) \times 6$$

wobei $\% (bi) =$ prozentualer Anteil biantennärer Strukturen bezogen auf die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten

30

$\% (tri) =$ prozentualer Anteil triantennärer Strukturen ohne zusätzliche N-Acetyl-Lactosamin-Einheit

11.07.12.99

- 20 -

% (tetra) = prozentualer Anteil tetraantennärer Strukturen
ohne zusätzliche N-Acetyl-Lactosamin-Einheit

% (tri + 1r) = prozentualer Anteil triantennärer Strukturen
mit 1 zusätzlichen N-Acetyl-Lactosa-
min-Einheit

% (tetra + 1r) = prozentualer Anteil tetraantennärer Struk-
turen mit 1 zusätzlichen N-Acetyl-Lactosa-
min-Einheit

% (tri + 2r) = prozentualer Anteil triantennärer Struktu-
ren mit 2 zusätzlichen N-Acetyl-Lactosa-
min-Einheiten

% (tetra + 2r) = prozentualer Anteil tetraantennärer Struk-
turen mit 2 zusätzlichen N-Acetyl-Lactosa-
min-Einheiten.

Das Produkt aus Anzahl der N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten pro Glykosilie-
rungsstelle multipliziert mit dem jeweiligen Sialinsäuregehalt ergab bei EPO
aus CHO-Zellen einen Wert von 53,7. Bei den 4 EPO-Präparaten aus
humanen Zellen waren die entsprechenden Werte 58,9 (Präparat 1), 52,5
(Präparat 2), 51,3 (Präparat 3) und 40,4 (Präparat 4).

Ansprüche

1. EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie im wesentlichen aus glykosilierten EPO-Molekülen besteht,
die einen Anteil von mindestens 75% tetraantennären Strukturen
bezogen auf die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten enthalten.
2. EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie aus glykosylierten EPO-Molekülen besteht, die einen mittleren
Anteil von mindestens 75% tetraantennären Strukturen bezogen auf
die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten enthalten.
3. EPO-Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Anteil der tetraantennären Strukturen mindestens 80% ist.
4. EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie im wesentlichen aus glykosylierten EPO-Molekülen besteht,
die eine Anzahl von mindestens 3,7 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten
bezogen auf eine Glykosilierungsstelle der EPO-Moleküle enthalten.
5. EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie aus glykosylierten EPO-Molekülen besteht, die eine Anzahl
von mindestens 3,7 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf eine
Glykosilierungsstelle der EPO-Moleküle enthalten.

6. EPO-Zusammensetzung nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anzahl von N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten mindestens 4,0
ist.
- 5 7. EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie die Merkmale von mindestens zwei der Ansprüche 1, 2, 4
und 5 aufweist.
- 10 8. EPO-Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Gemisch aus 2 bis 5 Isoformen umfasst.
- 15 9. EPO-Zusammensetzung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Gemisch aus 3 bis 4 Isoformen umfasst.
- 20 10. EPO-Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine spezifische Aktivität in vivo von mindestens
200 000 IU/mg Protein aufweist.
- 25 11. EPO-Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der mittlere Sialinsäuregehalt pro Molekül mindestens 11 beträgt.
- 30 12. EPO-Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die EPO-Moleküle das Produkt einer Expression exogener DNA
in Säugerzellen sind.

13. EPO-Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**,
daß die EPO-Moleküle das Produkt einer Expression endogener DNA in humanen Zellen sind.

5

14. EPO-Zusammensetzung nach Anspruch 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet**,
daß die Kultivierung der Zellen in einem serumfreien Medium erfolgt ist.

10

15. Pharmazeutisches Präparat, **dadurch gekennzeichnet**,
daß es als Wirkstoff eine EPO-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 als Wirkstoff gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Verdünnungs-, Hilfs- und Trägermitteln enthält.

15

16. Verfahren zur Gewinnung einer EPO-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**,
daß man die EPO-Zusammensetzung mit den gewünschten Merkmalen erhält durch mindestens eine der Maßnahmen:

20

(a) Auswahl einer geeigneten Produktionszelle, welche in der Lage ist, Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Strukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten zu erzeugen,

25

(b) Auswahl von geeigneten Kultivierungsbedingungen bei der Zellkultur, um Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Struktur oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten zu erzeugen und

30

(c) Abtrennung unerwünschter Bestandteile aus einer bekannten Zusammensetzung von EPO-Molekülen unter Anreicherung von

EPO-Molekülen, die Kohlenhydratketten mit einem hohen Anteil tetraantennärer Strukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten enthalten.

- 5 17. Verfahren zur Erhöhung der spezifischen Aktivität einer EPO-Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß man EPO-Moleküle mit einem hohen Anteil an tetraantennären Kohlenhydratstrukturen oder/und N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten in der Zusammensetzung anreichert.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anreicherung bis auf einen mittleren Anteil von mindestens
15 75% tetraantennären Strukturen bezogen auf die Gesamtzahl von Kohlenhydratketten erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Anreicherung bis auf eine mittlere Anzahl von mindestens 3,7 N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten bezogen auf eine Glykosilierungsstelle des EPO-Moleküls erfolgt.
- 25 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17-19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anreicherung durch eine oder mehrere der Maßnahmen (a), (b) und (c) gemäß Anspruch 16 erfolgt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue EPO-Zusammensetzungen mit hoher Spezifität,
 5 die durch einen hohen Anteil an N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten oder/und
 tetraantennären Verzweigungen in der Kohlenhydratstruktur gekennzeichnet
 sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen solcher
 EPO-Produkte.

10

vo 03.12.97 08:42

